

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

47



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/27</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/16205</p> <p>(43) 国際公開日 1997年5月9日(09.05.97)</p>																				
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03105</p> <p>(22) 国際出願日 1996年10月23日(23.10.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/300728 1995年10月24日(24.10.95) JP</p> <p>(71) 出願人：および (72) 発明者 中村敏一(NAKAMURA, Toshikazu)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市高見台10-27 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p>																				
<p>(54)Title: ANTITUMOR AGENT</p> <p>(54)発明の名称 抗癌剤</p> <p>(57) Abstract An antitumor agent containing the α-chain protein (α-fragment) of an HGF (hepatocyte growth factor) as an active ingredient. The α-fragment as the active ingredient functions as an antagonist which specifically inhibits the ability of cancer cells to invade or metastasize by means of HGF. This drug is specifically effective in inhibiting the invasion and metastasis of cells of cancers such as gallbladder and lung cancers, which are highly metastatic and result in a high lethality. It is used as an antitumor agent for cancer therapy, prevention, etc., and is highly useful clinically.</p> <div data-bbox="998 1176 1437 1606"> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>侵入細胞数 (個/視野)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>対照</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>HGF 0.3 ng/ml</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>HGF 3 ng/ml</td> <td>4.5</td> </tr> <tr> <td>HGF 30 ng/ml</td> <td>9.5</td> </tr> <tr> <td>c (a = 130)</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td>d (a = 300)</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>e (a = 1,300)</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>f (a = 3,000)</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>g (a = 13,000)</td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="998 1627 1437 1816"> <p>a ... Number of invaded cells (per visual field)</p> <p>b ... control</p> <p>c ... a = 130</p> <p>d ... a = 300</p> <p>e ... a = 1,300</p> <p>f ... a = 3,000</p> <p>g ... a = 13,000</p> </div>			Category	侵入細胞数 (個/視野)	対照	1.0	HGF 0.3 ng/ml	1.5	HGF 3 ng/ml	4.5	HGF 30 ng/ml	9.5	c (a = 130)	5.5	d (a = 300)	2.5	e (a = 1,300)	1.5	f (a = 3,000)	0.5	g (a = 13,000)	0.2
Category	侵入細胞数 (個/視野)																					
対照	1.0																					
HGF 0.3 ng/ml	1.5																					
HGF 3 ng/ml	4.5																					
HGF 30 ng/ml	9.5																					
c (a = 130)	5.5																					
d (a = 300)	2.5																					
e (a = 1,300)	1.5																					
f (a = 3,000)	0.5																					
g (a = 13,000)	0.2																					

(57) 要約

本発明は、HGF (Hepatocyte growth factor)の α 鎖蛋白質 (α -フラグメント)を有効成分として含有する抗癌剤に関する。有効成分である α -フラグメントは、高転移性で致死率の高い胆嚢癌や肺癌を初めとする癌細胞に対して特異的な癌浸潤・転移抑制効果を有する。従って、本発明の薬剤は、抗癌剤として、癌の治療、予防などに用いられ、臨床上極めて有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BB	バベール	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SZ	ス威士ランド
BG	ブルガリア	CN	中国	MG	マダガスカル	TD	チャド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HE	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BS	バハマ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TR	トルコ
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CC	中東	JP	日本	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボワール	KZ	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	LA	ラオス	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CN	中国	LI	リベリア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CO	コロンビア			PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

抗 癌 剤

5 技術分野

本発明は抗癌剤に関する。より詳細には、HGF (Hepatocyte Growth Factor)の α 鎖を有効成分とし、そのc-Met/HGFレセプターアンタゴニスト活性に基づき、制癌、特に癌浸潤・転移抑制を可能とする新しい抗癌剤に関する。

10 背景技術

癌の制圧は、今日の医療における最大の課題であり、また新規癌治療法あるいは新抗癌剤は医療・医薬研究者の最大の関心事である。現在、日本における死因の第1位は癌であり、毎年多くの新しい患者が発生している。

15 化学療法に用いられる抗癌剤として、従来のアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質のほかに、ピシバニール（商品名、中外製薬社製）やクレスチン（商品名、三共製薬社製）を初めとする微生物由来の生体反応修飾物質が全盛を極めた。従来のアルキル化剤を初めとする化合物は本来、細胞毒性を利用するものであり、少なからぬ副作用のために使用がかなり限定されたのに比べ、その後のピシバニールなどの生体反応修飾物質は生体の免疫機能を高め、癌細胞を駆逐するという作用を有する。

20 しかし、その限界が明らかになると共に、インターフェロンやインターロイキン-2やTNF（腫瘍壊死因子）など、高等動物由来の生理活性蛋白に重点が置かれるようになった。しかしながら、これらも作用スペクトルが発見当初予想されたものよりはるかに広範囲であったため、副作用を示さないという認識も覆されてしまった。

25 このような状況のなかで、癌治療が単なる癌病巣の撃退をもって評価するだけでなく、生体のトータルな機能の改善の中での治療を考える「クオリティ・オブ・ライフ」に焦点が移りつつあることは間違いなく、本発明者が発見したHGFが抗癌剤の有効成分であることはすでに報告済みである（日本特開平6-25010号公報）。

30 上述のごとく、既成の抗癌剤がその副作用や、あるいは抗癌作用そのものへの疑問から、決定的な治療薬とはいいがたく、さらに次世代を担う生理活性蛋白質もこ

れまで開発されたものは主に免疫系にかかわる因子であり、必ずしも究極の抗癌剤として広く利用されることを期待できない状況にある。そこで、同じく生体が本来持っている生理活性蛋白質の中でもその生理作用が明解で、しかも活性のスペクトルがよく研究されているものの中から、真の抗癌剤を見いだすことが重要になってくる。特に、従来開発されてきた生理活性蛋白質、インターフェロンあるいはインターロイキン等はほとんど免疫系にかかわる因子であることから、全く異なる作用を有する生体因子がこれからの抗癌剤として重要であると考えられる。

ところで、日本においては癌が死因のトップを占めていることは前述の通りであるが、その危険性は癌細胞の浸潤・転移能に依存しているといっても過言ではない。いくつかの増殖因子が癌細胞の浸潤・転移能に関与することが報告されているが、最近HGFが種々の癌細胞に対し、その浸潤、転移能を強力に誘導する因子であることが明らかにされた(H. Shimura et al. J. Jap. Cancer Res. 86, 662-669, 1995)。実際に極めて悪性度が高いとされている肺癌や胆嚢癌の浸潤能はHGFに依存して誘導され、また肺癌原発組織中のHGFレベルは肺癌の悪性度、致死率とよく相関するリスクファクターであることが確認されている。

上記のHGFは肝実質細胞を *in vitro* で増殖させる因子として見出された蛋白質である (Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489, 1986, FEBS Letter, 22, 311, 1987, Nature, 342, 440, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3200, 1990)。肝実質細胞を特異的に増殖させる因子として発見されたHGFは、本発明者らをはじめとする多くの研究者による最近の研究成果によって、生体内で組織傷害治癒などの種々の活性を示している事が明らかとなり、研究対象としてのみならずヒトや動物の治療薬などへの応用に期待が集まっている。このようなHGFの受容体(レセプター)に関して、最近の研究から、c-Met 原腫瘍遺伝子がHGF受容体をコードしていることが確定的になった(Bottaro et al., Science 251, 802-804, 1991; Naldini et al., Oncogene 6, 501-504, 1991)。

上述のように、HGFが種々の癌細胞に対し、その浸潤、転移能を強力に誘導する因子であることが明らかになってきており、HGFによる癌細胞の浸潤・転移能を特異的にブロックするアンタゴニスト (antagonist) ならびにインヒビターの開発は制癌という観点で極めて重要な研究課題であると考えられる。

発明の開示

本発明者はかかる観点から鋭意検討を行った結果、HGFの有する癌細胞の浸潤・転移能を抑制する活性、すなわち、細胞のc-Met/HGFリセプターに対する
5 アンタゴニスト活性を有する物質を見出し、当該物質が癌細胞の浸潤、転移能を抑制し、抗癌剤として極めて有用であるという知見を得て本発明を完成するに至った。従って、本発明の目的は、細胞のc-Met/HGFリセプターのアンタゴニスト活性に基づく抗癌剤として極めて有用な医薬品を提供することにある。

即ち、本発明は、下記の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質（以下、便宜
10 上、 α -フラグメントと称する）を有効成分として含有する抗癌剤である。

a) HGFの α 鎖からなる；

b) 分子量が約55-69 kDaである；

c) c-Met/HGFリセプターのアンタゴニスト活性を有する。

また、本発明の他の発明は、有効量の α -フラグメントをヒト又は哺乳動物に投
15 与することからなる癌疾患の治療法であり；また抗癌剤を製造するための α -フラグメントの使用である。

図面の簡単な説明

図1は、HGF-酵素消化物を逆層HPLCで精製したときのクロマトグラムで
20 ある。

図2は、逆層HPLCで精製したHGF-酵素消化物を電気泳動（SDS-PAGE、還元条件下）に付した結果を示す電気泳動写真である。

図3は、MDCK細胞に対する α -フラグメントのスキヤタリング効果を示す写真である。

図4は、HGFの共存下におけるMDCK細胞に対する α -フラグメントのスキヤタリング効果を示す写真である。

図5は、ラット肝細胞のDNA合成に対するHGF、EGF、 α -フラグメントの効果を示す図である。図中、(a)はHGFを添加した系、(b)は α -フラグメントを添加した系、(c)は5 ng/mlのHGF共存下に α -フラグメントを
30 添加した系、(d)は10 ng/mlのEGF共存下に α -フラグメントを添加し

た系である。

図6は、GB-d1細胞の浸潤に対する α -フラグメントの効果を示す写真である。

図7は、HGFの共存下におけるGB-d1細胞の浸潤に対する α -フラグメントの効果を示す写真である。

図8は、図6及び図7の結果を図表化したものである。

発明を実施するための最良の形態

前述のように、本発明者は、年余にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果HGFを単離精製することに成功した。HGFは元来、肝実質細胞増殖を促進する因子として発見されたポリペプチドであるが、細胞増殖制御に加え、細胞運動 (cell motility) を促進するモトゲン(motogen)として働く (T. Nakamura, Prog. Growth Factor Res., 3, 67-85, 1991) ことは発明者によってもとより見いだされた事実である。HGFによる細胞の運動性亢進には、 β -カテニンのりん酸化によるカドヘリンを介した細胞間接着の減少、rho small Gタンパク質の活性化を介する情報伝達系が関与している。さらに最近、rhoの下流にp125FAK(focal adhesion kinase)が位置し、HGFによって一過的なp125FAKのりん酸化が起こることが明らかになった (K. Matsumoto et al. J. Biol. Chem. 269, 31807-31813, 1994)。HGFの刺激後、初期の焦点接着(focal adhesion)の形成、細胞骨格の再構成にp125FAKのりん酸化が関与しており、HGFによる細胞の運動性亢進において細胞-マトリックスとの相互作用はp125FAKを介して調節されていると考えられる。

癌細胞の増殖能や浸潤・転移能は、癌細胞をとりまく間質細胞との相互作用を介して大きく影響されることが古くから知られている(tumor-host relationship)。発明者は宿主間質に由来するHGF、ならびに癌細胞に由来するHGF誘導因子 (インジュリン) が癌の悪性化 (増殖能や浸潤・転移能) に関与することを明らかにした (K. Matsumoto et al. Gann Monograph No.42: Growth Factors: Cell growth, Morphogenesis and Transformation, CRC press 92-112, 1994; K. Rygaard et al. Intern. J. Oncology, 2, 991-996, 1993; W.G. Jiang et al. Clin. & Exp. Metastasis, 11, 235-242, 1993; S.P. Seslar et al. Cancer res., 58, 1233-1238, 1993; N. Rahimi et al. DNA and Cell Biol., 13, 1189-1197, 1994; S. Bellusci

et al. *Oncogene*, 9, 1091-1099, 1994)。

胆嚢癌は一般に高転移性で致死率の高い悪性癌である。ヒト胆嚢癌細胞は宿主間質組織内では高い浸潤能を有するが、*in vitro*のコラーゲンゲル上での培養下では自らゲル内に浸潤することはない。ところが、正常間質線維芽細胞とコラーゲンゲルをはさんで共培養すると胆嚢癌細胞はゲル内に活発に浸潤し、液性因子を介した間質細胞との相互作用により胆嚢癌細胞の浸潤能が誘導される。しかも、共培養下での癌細胞の浸潤は抗HGF抗体の添加により完全に阻害され、間質由来の浸潤因子(*invasion factor*)がHGFであることが明らかになった。この胆嚢癌細胞のゲル内浸潤は代表的な増殖因子であるEGF、TGF- β 、PDGF、bFGFなどでは誘導されず、HGFに特異的である。一方、胆嚢癌細胞は間質線維芽細胞のHGF産生を誘導する因子を産生分泌し、このHGFインデューサーの実体がIL-1 β であることが明らかになった。ヒト胆嚢癌細胞に限らず多くのカルシノマ(*carcinoma*)、例えば口腔粘膜上皮癌細胞などの間質由来浸潤因子(*stromal-derived invasion factor*)の実体がHGFであることも明らかになった (K. Rygaard et al. *Intrn. J. Oncology*, 2, 991-996, 1993; W.G. Jiang et al. *Clin. & Exp. Metastasis*, 11, 235-242, 1993; S.P. Seslar et al. *Cancer Res.*, 58, 1233-1238, 1993; N. Rahimi et al. *DNA and Cell Biol.*, 13, 1189-1197, 1994)。

癌細胞の浸潤・転移を防ぐことができれば癌による死亡率は著しく減少するといわれている。しかも癌の80%以上がカルシノマであり、これらのほとんどはc-Met/HGFレセプターを発現するHGF標的細胞である。このことから、HGFによる癌細胞の浸潤・転移能をブロックするアンタゴニストの開発は重要である。

しかるに本発明者らはHGFの引き続く研究において以下の点を明らかにした。HGFは約69 kDaの α 鎖と約34 kDaの β 鎖からなるヘテロダイマーである。HGFの α 鎖にはN末端ヘアピンドメインと4個のクリングルドメインが存在し、 β 鎖にはセリンプロテアーゼ様ドメインが存在しており、HGFは非常にユニークなドメイン構造を有する増殖因子である。本発明者らは既にHGF分子内のドメイン構造を欠失した種々の変異HGFを遺伝子工学的に作製し、 α 鎖内のN末端ヘアピンならびに第一、第二クリングルドメインがc-Met/HGFレセプターに結合する最小ドメインであることを明らかにした。従って、この最小レセプター結合ドメイン内に遺伝子工学的に変異を導入することによりHGFレセプター-アンタ

ゴニストの作製も可能になると考えられる。従来、癌細胞の浸潤・転移を抑制する因子の解明はそのほとんどが癌細胞に由来するマトリックスプロテアーゼを標的としたものであるが癌細胞の浸潤・転移をブロックする有効な物質は解明されていない。

- 5 それに対し、本発明は癌細胞の浸潤・転移を誘導するシグナルをその上流で遮断することを目的としており、全く新しい戦略に基づいている点が大きな特色であり、先駆的な発明である。

10 本発明の抗癌剤は、前述の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質（ α -フラグメント）を有効成分とすることからなり、当該蛋白質は、例えば、HGFを酵素的に分解する方法、遺伝子工学的技術を用いて調製する方法、化学的に調製する方法などにより得ることができる。

15 上記の酵素的分解法に用いられるHGFとしては、種々の方法で調製されたものを用いることができる。すなわち、HGFの調製方法としては、各種の方法が知られている。例えば、ラット、ウシ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤などの臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる（FEBS Letters, 224, 312, 1987; Proc. Acad. Sci. USA, 86, 5844, 1989など参照）。

20 また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物（培養上清、培養細胞等）から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる（例えば、Nature, 342, 440, 1989; 日本特開平5-111383号公報; 日本特開平3-255096号公報; Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989など参照）。

25 上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

30 より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を抽出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィー、HPL

Cなどの通常の蛋白質精製法にて精製することができる。

また、HGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を通常の遺伝子工学的な手法により動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、マウスC127細胞、サルCOS細胞、Sf（*Spodoptera frugiperda*）細胞などに形質転換し、その培養上清より得ることができる。HGFはヒト由来のものでも、哺乳動物由来のものでも用いることができるが、好ましくはヒト由来のものがよく、更に好ましくは、ヒト由来の組換えHGF（日本特開平5-111383号公報）がよい。

かくして得られたHGFはHGFと実質的に同効である限り、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸に置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び/又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されてもよい。

HGFの酵素的分解は、例えば、エラスターゼ等の酵素を用いてHGFを消化することにより行なうことができる。ついで、高速液体クロマトグラフィー等の慣用の蛋白精製法を用いて消化生成物を精製し、 α 鎖が含まれるフラグメントが約55-69 kDaからなる低分子HGFを単離することにより、前記の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質（ α -フラグメント）を得ることができる。

本発明の α -フラグメントは、上記の方法により得られたものに限定されるものではなく、慣用のペプチド合成法に準じて化学的に調製したものでもよく、また α -フラグメントのアミノ酸配列をコードする遺伝子を調製し、それを用いて前記の遺伝子工学的な手法により産生させたものであってもよい。

後記実施例に示されるように、 α -フラグメントはHGFのマイトゲン（mitogen）及びモトゲン活性を阻害するなどc-Met/HGFリセプターのアンタゴニスト活性を有し、癌細胞の浸潤を抑制することが判明した。従って、 α -フラグメントを有効成分とする本発明の薬剤は、ヒト及び哺乳動物（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等）の抗癌剤、特に癌細胞の浸潤抑制剤、転移抑制剤として有用である。

本発明の他の発明は、上述の α -フラグメントの有効量をヒト及び哺乳動物（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等）に投与することからなる癌疾患の治療法；抗癌剤を製造するための上述の α -フラグメントの使用である。

本発明の抗癌剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）を

とりうるが、一般的には有効成分である α -フラグメントのみ又はそれと慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に経口剤とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、 α -フラグメントを適切な溶媒（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、
5 次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中の α -フラグメント含量としては、通常0.0002-0.2(w/v%)程度、好ましくは0.001-0.1(w/v%)程度に調整される。また、経口薬としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟又は硬カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤などの剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。製剤中の α -
10 フラグメント含量は、剤形、適用疾患などに応じて適宜調整することができる。

製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んで
15 いてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

本発明の製剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。
20 その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、通常 α -フラグメントとして0.01mg-100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

産業上の利用可能性

25 本発明において、有効成分である α -フラグメントは、高転移性で致死率の高い胆嚢癌や肺癌を初めとする癌細胞に対して特異的な癌浸潤・転移抑制効果を有する。従って、本発明の抗癌剤及び治療方法は、癌の治療、予防などに用いられ、臨床上極めて有用である。

実施例

以下に実施例及び試験例を示し、本発明をより具体的に述べるが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

HGFの α -フラグメントの単離精製

- 5 遺伝子組換えHGF900mgをエラスターゼで1時間消化し、これを逆相HPLC(C4)で精製した。そのクロマトグラムを図1に示す。図1に示されるように、4個のピークが得られ、第一のピークが α -フラグメント、第二のピークが未消化のHGF、第三と第四のピークが β 1、 β 2であることが同定された。さらに、凍結乾燥システムで溶媒を除去し、それぞれの分画を集めて再蒸留水で再懸濁した。そうして得られた物質が α 、 β -フラグメントであることをSDS-PAGEでさらに確認した（図2参照）。蛋白定量の結果、 α -フラグメントは178mg取得された。
- 10

実施例 2

MDCK細胞を用いたモトゲンとしての作用の解析

- 15 MDCK細胞を10%FBS加DMEM培地で 2×10^4 細胞/mlに調製し、48ウェルプレートに250 μ l/ウェルでまきこんだ。 α -フラグメントを単独で10ng/mlから10 μ g/ml加えて24時間培養し、位相差顕微鏡で観察した。その結果を図3に示す。図3に示されるように、 α -フラグメントにはスキヤタリング(scattering)作用は認められなかった。続いて、HGF2ng/mlと同時に添加してHGFに対する阻害効果を調べた。その結果を図4に示す（図中、 α の表示は、HGFに対する α -フラグメント濃度（倍率）を示す。以下同様）。図4に示すように、1000倍濃度をこえるとスキヤタリングの抑制が濃度依存的に観察された。よって、 α -フラグメントはHGFのアンタゴニストであることが強く示唆された。
- 20

25 実施例 3

ラット肝細胞を用いたマイトゲンとしての作用の解析

- ラット肝細胞を48ウェルプレートで約50%面積を占めるように培養し、HGF、EGF、 α -フラグメントを添加して22時間培養した。 ^3H -BrdU(0.15mCi/ウェル)で4時間ラベルし、活性をシンチレーションカウンターで測定した。その結果を図5に示す。 α -フラグメントには 10^2 ng/mlから 10^4 ng/mlの範囲でDNA合成促進
- 30

作用は認められなかった。そして、HGF 5ng/mlと同時に加えるとHGFのミトゲン活性を濃度依存的に抑制することが明らかとなった（図5c参照）。ゆえに、 α -フラグメントはHGFのミトゲン、モトゲン活性に対してアンタゴニストであることが示された。

5

実施例4

α -フラグメントのHGF誘導癌細胞浸潤に対する作用

定量的であるマトリゲル インベイション チャンバー (Matrigel invasion chamber, 24ウェル)を用いた基底膜浸潤モデルでHGFの癌細胞浸潤誘導作用に対する α -フラグメントの効果を検討した。GB-d1細胞を 1.5×10^4 細胞/200ml/ウェルに調整して、アッパー チャンバー (upper chamber)にまきこんだ。ロワー チャンバー (lower chamber)の培地500mlにはHGF 2ng/mlと α -フラグメントを加えて24時間培養し、固定後H&Eで染色した。顕微鏡下に任意の10視野 (8.4mm^2)を観察し、フィルター下面に浸潤してきた細胞数で浸潤能を評価した。HGFは濃度依存的にGB-d1細胞の浸潤を促進した（図6参照）。HGF 3ng/mlに対する α -フラグメントの作用を検討したところ、 α -フラグメントはHGF 3ng/mlの130倍、400倍、4000倍、13000倍と濃度依存的にHGFの作用を阻害した（図7参照）。なお、図8に、図6及び図7の結果を図表化したものを示す。

上記の結果からして、 α -フラグメントは、HGFに誘導される癌細胞の浸潤を抑制する作用を有することが明らかになった。

20

製剤例1

生理食塩水100ml中に α -フラグメント1mg、マンニトール1g及びポリソルベート80 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

25

製剤例2

0.02Mリン酸緩衝液 (0.15M NaCl及び0.01%ポリソルベート80含有、pH7.4) 100ml中に α -フラグメント1mgとヒト血清アルブミン100mgを含む水溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

30

製剤例 3

注射用蒸留水 100 ml 中に α -フラグメント 1 mg、ソルビトール 2 g、グリシン 2 g 及びポリソルベート 80 10 mg を含む溶液を無菌的に調製し、1 ml ずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

5

10

15

20

25

30

請求の範囲

1. 下記の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質を有効成分として含有する抗癌剤。

- 5 a) HGFの α 鎖からなる；
b) 分子量が約55－69 kDaである；
c) c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有する。

2. HGFが遺伝子組換えにより製造したものである請求の範囲第1項記載の抗癌剤。

- 10 3. 遺伝子組換えの宿主細胞が、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞又は動物細胞の何れかである請求の範囲第2項記載の抗癌剤。

4. 下記の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質の有効量を投与することからなるヒト又は哺乳動物の癌疾患の治療法。

- 15 a) HGFの α 鎖からなる；
b) 分子量が約55－69 kDaである；
c) c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有する。

5. HGFが遺伝子組換えにより製造したものである請求の範囲第4項記載の癌疾患の治療法。

- 20 6. 抗癌剤を製造するための下記の理化学的性質及び生理活性を有する蛋白質の使用。

- a) HGFの α 鎖からなる；
b) 分子量が約55－69 kDaである；
c) c-Met/HGFレセプターのアンタゴニスト活性を有する。

- 25 7. HGFが遺伝子組換えにより製造したものである請求の範囲第6項記載の蛋白質の使用。

図 1

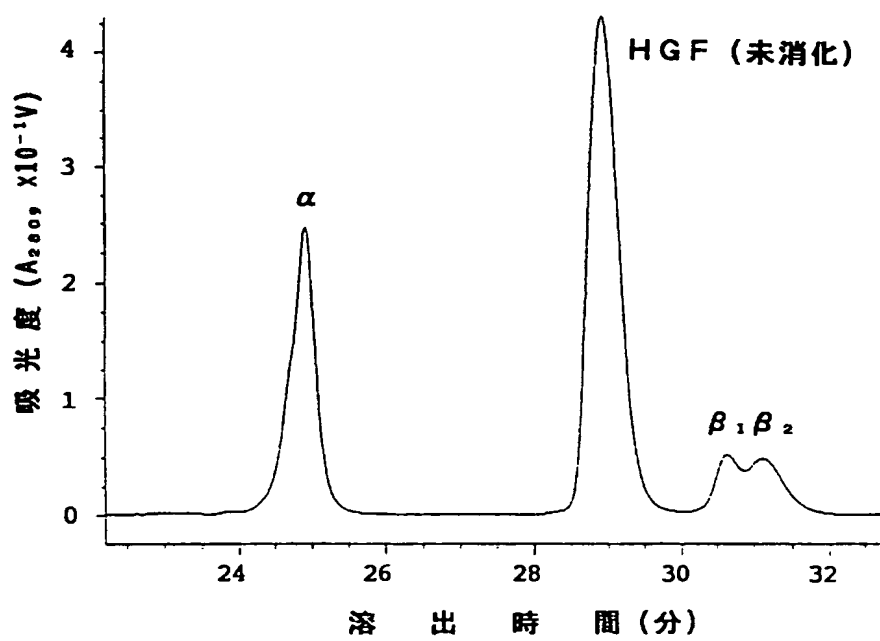


図 2

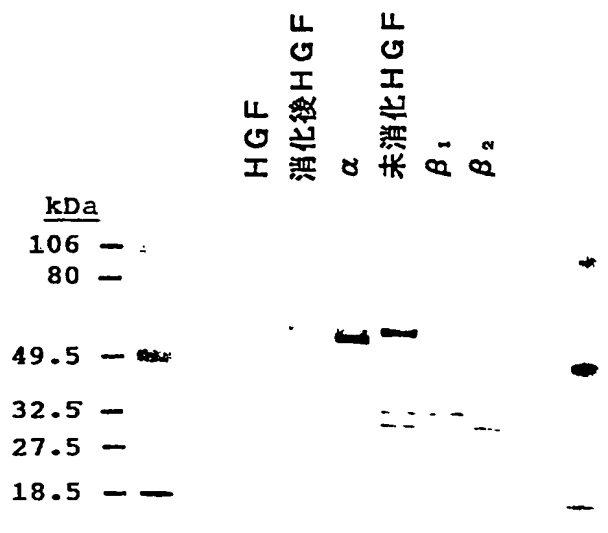


図 3

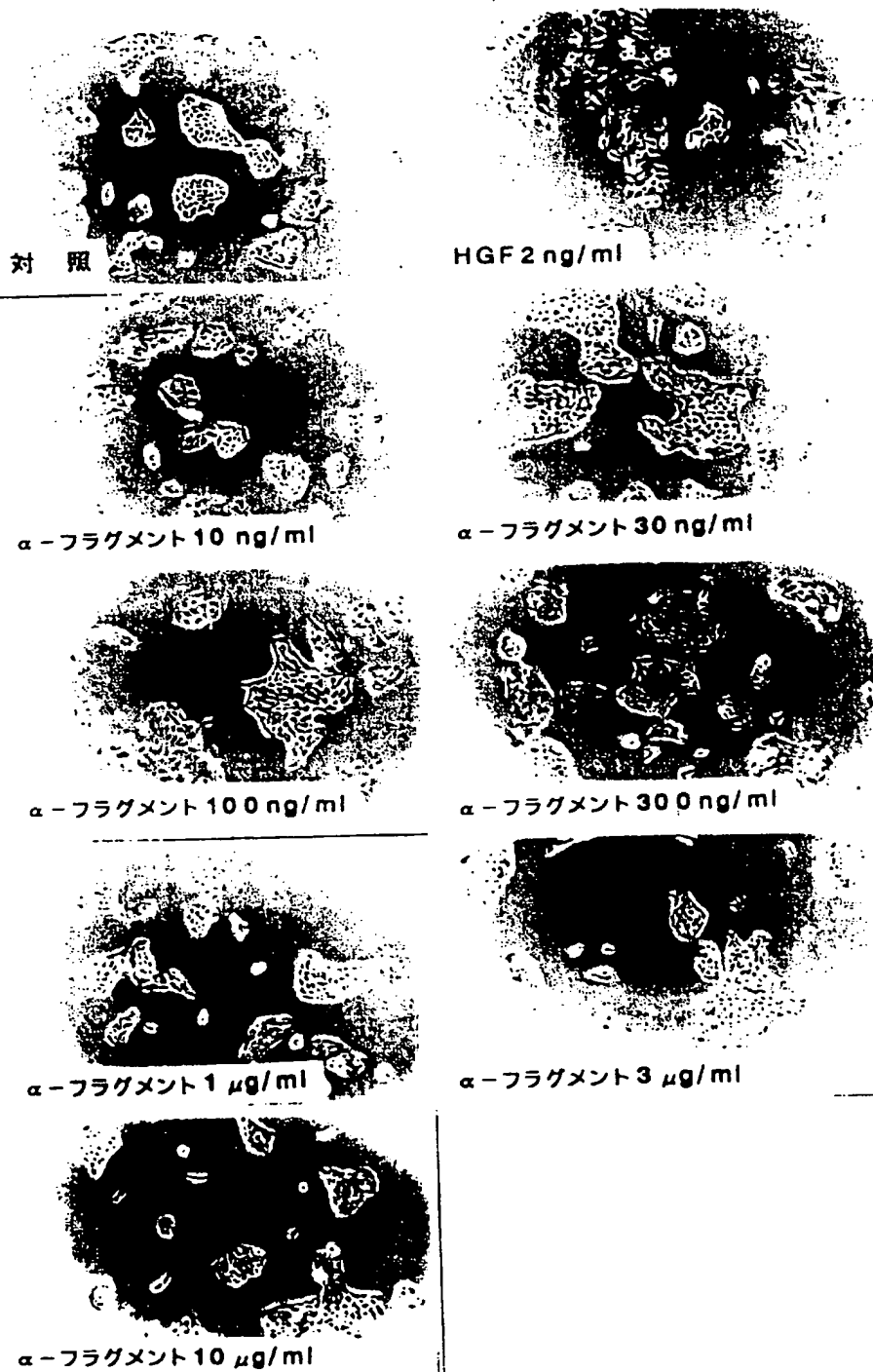


図 4

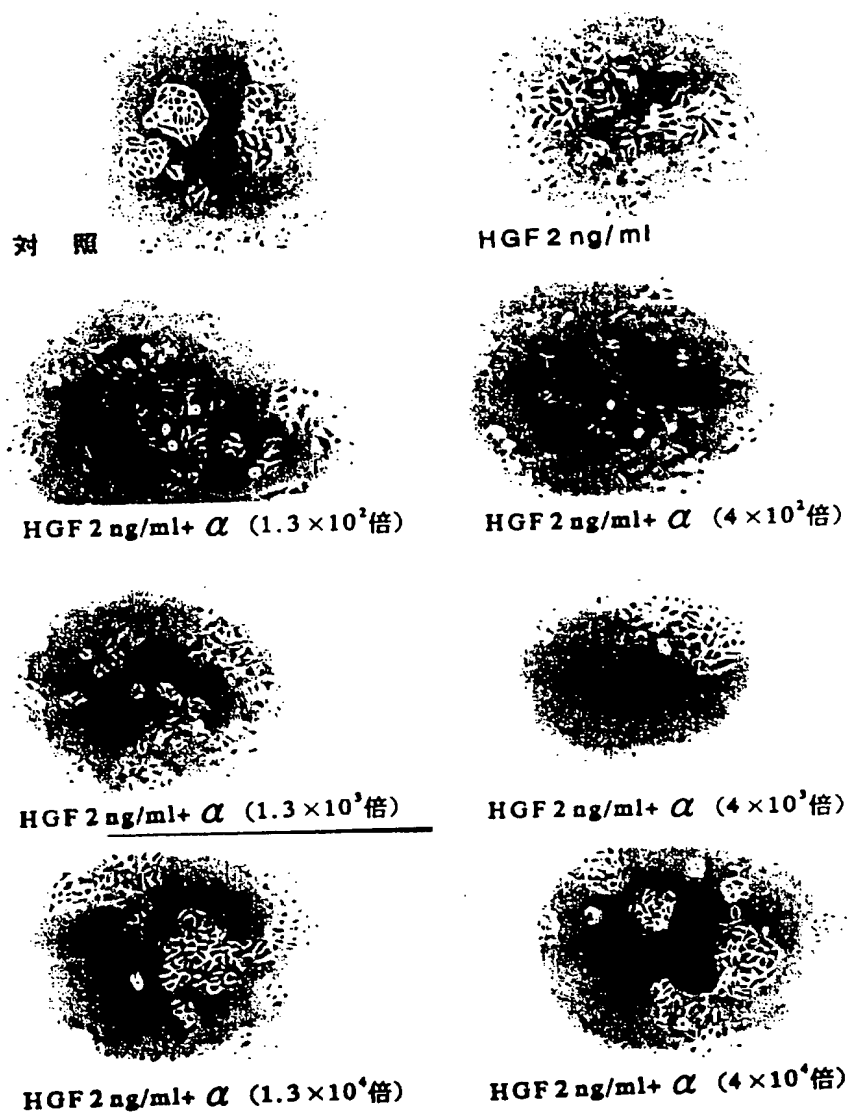


図 5

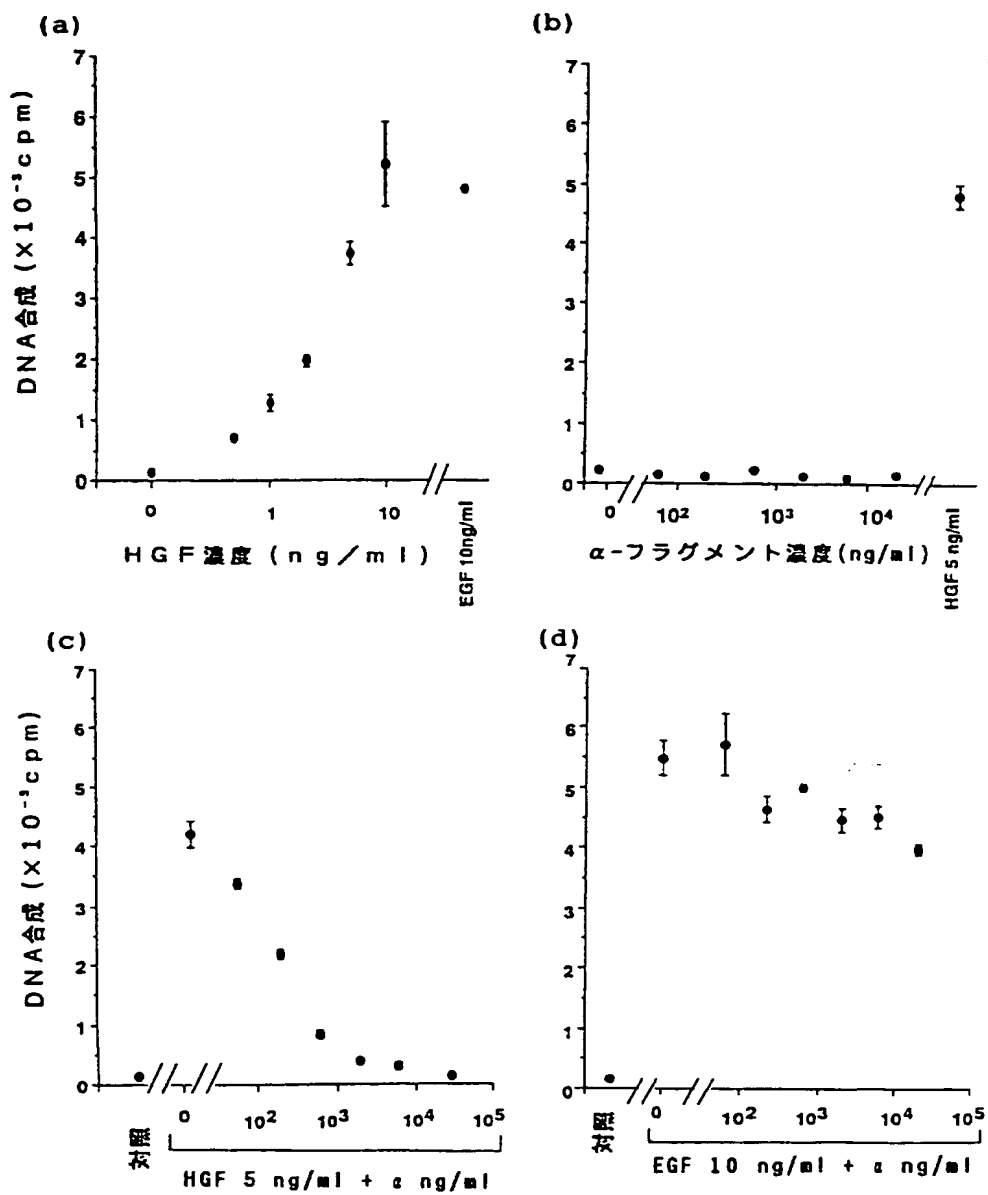


図 6

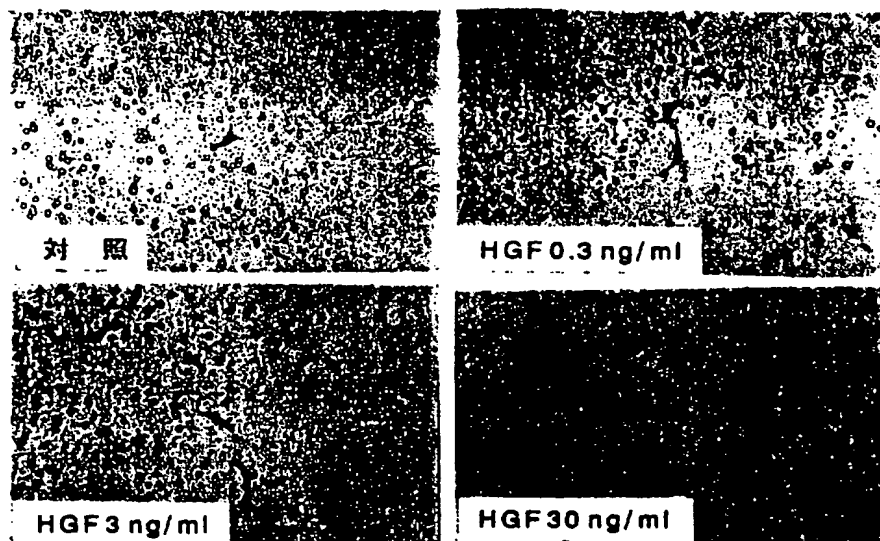


図 7

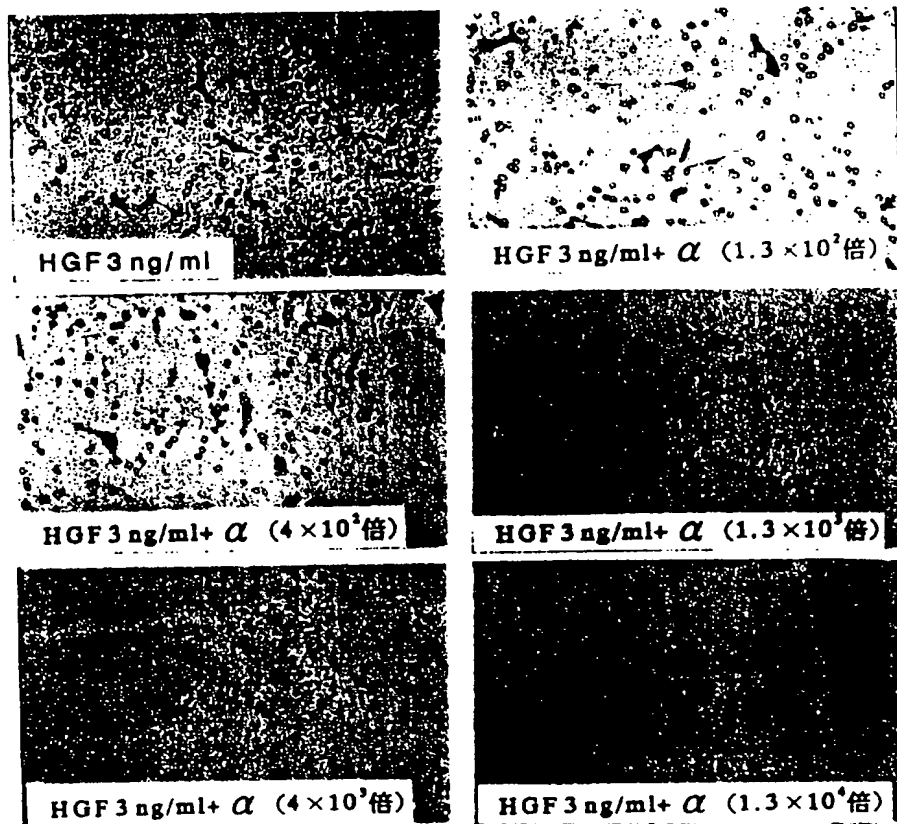
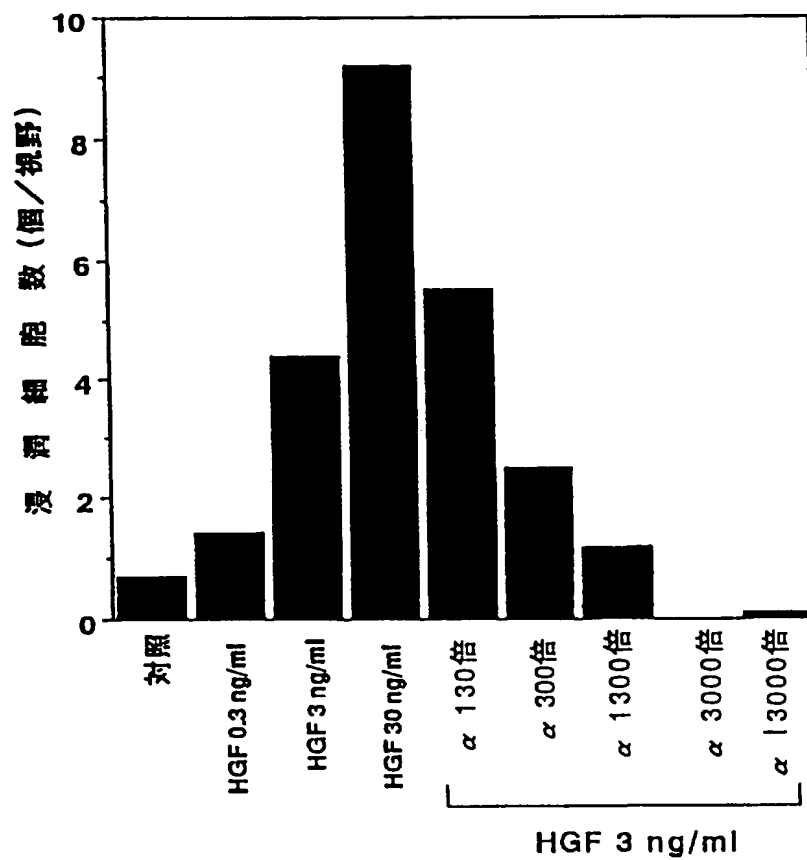


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K38/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K38/27

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science, Vol. 254, No. 5036 (1991), p. 1382-1385	1, 2, 3, 6, 7
Y	J. Biol. Chem., Vol. 268, No. 23 (1993), p. 17145-17150	1, 2, 3, 6, 7
Y	WO, 94/06909, A (The United States of America), March 31, 1994 (31. 03. 94) & EP, 662130, A & JP, 8-504093, A	1, 2, 3, 6, 7
Y	WO, 93/23541, A (Genentech, Inc.), November 25, 1993 (25. 11. 93), (p. 37:example 5, p. 41:refer to table 1) & EP, 642580, A & JP, 7-508420, A	1, 2, 3, 6, 7
A	JP, 6-25010, A (Toshikazu Nakamura), February 1, 1994 (01. 02. 94) (Family: none)	1, 2, 3, 6, 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
March 11, 1997 (11. 03. 97)

Date of mailing of the international search report
March 25, 1997 (25. 03. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03105

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4, 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4 and 5 pertain to methods for prophylaxis or treatment of humans or animals and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/03105

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A61K38/27

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A61K38/27

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS online

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Science, vol. 254, no. 5036 (1991), p. 1382-1385	1, 2, 3, 6, 7
Y	J. Biol. Chem., vol. 268, no. 23 (1993), p. 17145-17150	1, 2, 3, 6, 7
Y	WO, 94/06909, A. (THE UNITED STATES OF AMERICA) 31. 3月, 1994 (31. 03. 94) & EP, 662130, A & JP, 8-504093, A	1, 2, 3, 6, 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 03. 97

国際調査報告の発送日

25.03.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 93/23541, A (GENENTECH, INC.) 25. 11月, 1993 (25. 11. 93), (p. 37: 実施例5, p. 41: 表1参照) & EP, 642580, A & JP, 7-508420, A	1, 2, 3, 6, 7
A	JP, 6-25010, A (中村敏一) 1. 2月, 1994 (01. 02. 94) フ ァミリーなし	1, 2, 3, 6, 7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4, 5 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲4及び5は、人間又は動物の予防又は処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。